

B21

JP07031476A

MicroPatent Report

**DNA FRAGMENT HAVING PROMOTER FUNCTION IN  
CORYNEFORM BACTERIUM**

[71] **Applicant:** MITSUBISHI CHEM

[72] **Inventors:** HATAKEYAMA KAZUHISA;  
KOBAYASHI MIKI;  
YUGAWA HIDEAKI

[21] **Application No.:** JP05183595

[22] **Filed:** 19930726

[43] **Published:** 19950203

ATGCGTTC CTGGATTC ATCCACCT ATGGAGCG CGTCAGAC AGATTAAC 60  
TGTCAGCA AGGCGTC CTCGCGAC AGGTGAACT GTCAGCTGTC 170  
ATGATGAG TGCCTTT GAGCTTCT CTTGATTCGTT GTTGAGCGCT 180  
AGAGAACG TCGGATTC AATGACCT ATGGAGCG ATGGAGCT GTCAGCTA 240  
CGTATTCAG TCGGATTCGAG GAGGAGCG AGATGAGCG 250

[Go to Fulltext](#)

**[57] Abstract:**

PURPOSE: To obtain the subject DNA fragment, containing a specific base sequence having the promoter function in a specified coryneform bacterium, having increasing action on the expression intensity of a structural gene and useful for producing, etc., an amino acid, etc. CONSTITUTION: This DNA fragment contains a base sequence, expressed by the formula and having the promoter function in a coryneform bacterium derived from a gene coding a diaminopelargonate aminotransferase and a desthiobiotin synthetase in the coryneform bacterium.

[51] **Int'l Class:** C12N01509 C12N01509 C12R00113



(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-31476

(43)公開日 平成7年(1995)2月3日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup> 譲別記号 庁内整理番号 F I 技術表示箇所  
C 12 N 15/09 ZNA  
// (C 12 N 15/09 ZNA  
C 12 R 1:13)

9050-4B C 12 N 15/00 ZNA A  
(C 12 N 15/00 ZNA A

審査請求 未請求 請求項の数1 OL (全9頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平5-183595

(71)出願人 000006057

三菱油化株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(22)出願日 平成5年(1993)7月26日

(72)発明者 畠山 和久

茨城県稟敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72)発明者 小林 幹

茨城県稟敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72)発明者 湯川 英明

茨城県稟敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(74)代理人 弁理士 山本 隆也

(54)【発明の名称】 コリネ型細菌内でプロモーター機能を有するDNA断片

(57)【要約】

【構成】 ブレビバクテリウム・フラバムM J-233  
染色体から単離されたジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスクオピオチシンシンセターゼをコードする遺伝子に由来する285塩基対より成るプロモーター機能を有するDNA。

【効果】 このプロモーター機能を有するDNA断片を、タンパク質をコードする構造遺伝子とともにプラスミドベクターに組み込み宿主コリネ型細菌に導入した時に、該構造遺伝子が高発現する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コリネ型細菌内のジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオビオチンシンセ

AGTCCCTGTTG CTTGGGTTTG ATCAAGGCGT AATCCACCGG CTGCAACATC AAAATACAGG 60  
TAGTACACCA AGAGTGCTTG CATGCCGTAG AAGCTGAATC GCTCCCACAT TTCAATACTG 120  
ATTATTGAGG TTGGCGTTTT GAACCTAACCG CGTTGATCCA GTTGGACCAT GACTTCTCCT 180  
AACAGAAAGC TGCGGCAATG AAAAACACTT AGTGCACAAAA ATTGAACACT GTTCAATTAA 240  
CCTATTACAC TGCACATATG CAACCAAACC AAGTGACCGA GGAAA 285

を含むDNA断片。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はコリネ型細菌内のジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオビオチンシンセターゼをコードする遺伝子に由来するコリネ型細菌内でプロモーター機能を有する新規なDNAを含むDNA断片に関する。

【0002】

【従来の技術】 ブレビバクテリウム属細菌を含むコリネ型細菌は、アミノ酸、有機酸、プリンヌクレオチド等を生産する工業的に有用な微生物であるが、組換えDNA技術の導入による菌株の育種改良は、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 等に比べて遅れている。特に、プラスミドベクターに挿入された構造遺伝子のコリネ型細菌内での発現のために必要なプロモーターの構造に関する知見は極めて少く、コリネ型細菌を宿主として用いて構造遺伝子を発現させようとする場合にはかなり問題となっている。

【0003】 一方、本発明者らは先にコリネ型細菌染色体からビオチン合成に関与するジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオビオチンシンセターゼをコードする遺伝子を単離し提案した(特願平3-174757号明細書参照)。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の主たる目的は、プラスミドベクターに挿入された構造遺伝子をコリネ型細菌内で確実に発現せしめるようなプロモーター機能を有する新規なDNA断片を取得することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、コリネ型細菌内でプロモーター機能を有するDNAを鋭意検索した結果、本発明者が先に提案したコリネ型細菌内のジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオビオチンシンセターゼをコードする遺伝子(以下これを「bioAbioD」ということがある; 特願平3-174757号明細書参照) 上流の285bpのDNAがコリネ型細菌内でプロモーター機能を有することを見いだし、本発明を完成するに至った。

【0006】 すなわち、本発明は、コリネ型細菌内のジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオビオチンシンセターゼをコードする遺伝子(bio

ターゼをコードする遺伝子に由来するコリネ型細菌内でプロモーター機能を有する下記の塩基配列:

AbioD) に由来するコリネ型細菌内でプロモーター機能を有する後記配列表の配列番号: 1に示される285bpの塩基配列を含むDNA断片である。以下、本発明についてさらに詳細に説明する。

【0007】 本明細書において、「プロモーター機能を有するDNA」とは、遺伝子の転写を開始するためにRNAポリメラーゼが特異的に結合するDNA上の領域であって、タンパク質をコードする構造遺伝子とともにプラスミドベクターに組み込まれ宿主コリネ型細菌に導入された時に、該構造遺伝子の発現強度の増加作用を有するDNAを意味する。

【0008】 本発明のプロモーター機能を有するDNAは、通常はコリネ型細菌内のbioAbioDを含むDNA断片から得ることができる。上記bioAbioDを含むDNA断片の供給源となる微生物は、コリネ型細菌であれば特に限定されるものではないが、一般的には、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233(FERM BP-1497)およびその由来株、ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス(*Brevibacterium ammoniagenes*) ATCC6871、同ATCC13745、同ATCC13746、ブレビバクテリウム・デバリカタム(*Brevibacterium divaricatum*) ATCC14020、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム(*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869、コリネバクテリウム・グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831等が有利に使用される。

【0009】 これらの供給源微生物からbioAbioDを含むDNA断片を調製するための基本操作の一例を述べれば次のとおりである。上記bioAbioDを含む断片は、上記コリネ型細菌、例えばブレビバクテリウム・フラバムMJ-233株(FERM BP-1497)の染色体上に存在し、この染色体を適当な制限酵素で切断することにより生ずる切断断片の中から以下に述べる方法で分離、取得することができる。

【0010】 先ず、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233株の培養物から染色体DNAを抽出する。この染色体DNAを適当な制限酵素、例えばSau3A1を用いて、DNA断片の大きさが約20~30kbになるように部分分解する。得られたDNA断片をコスミドベ

クター例えばpWE15に挿入し、このコスミドを、*λ*DNA *in vitro* Packaging Kitを用いる形質導入により、*bioA*あるいは*biobD*の欠損した大腸菌変異株 (Journal of Bacteriology, vol 94, p2065-2066, 1967及びJournal of Bacteriology, vol 112, p830-839, 1972参照) に導入する。この大腸菌変異株を、ビオチンを含まない選択培地に塗沫する。

【0011】得られる形質転換株よりコスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたプレビバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体由来の*bioAbiobD*を含む断片を確認・取得することができる。かくして得られる*bioAbiobD*を含む断片は、大きさが約20~30kbと大きく、実用的ないので、さらに短かい断片に特定化する必要がある。

【0012】次に、上記で得られた*bioAbiobD*を含む断片を含むコスミドを適当な制限酵素を用いて切断し、得られるDNA断片を、大腸菌で複製可能なベクタープラスミドに挿入しこのベクタープラスミドを通常用いられる形質転換法、例えば、塩化カルシウム法あるいは電気パルス法による形質転換により、前記*bioA*あるいは*biobD*の欠損した大腸菌変異株に導入する。この大腸菌変異株を、ビオチンを含まない選択培地に塗沫する。

【0013】得られる形質転換株よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたプレビバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体由来の*bioAbiobD*を含む断片を確認・取得することができる。このようにして得られる*bioAbiobD*を含む断片の一つは、前記プレビバクテリウム・フラバムMJ-233株の染色体DNAを制限酵素Sau3AIの部分分解により切り出し、さらにそれを、制限酵素Sa

Iで切り出すことによって得られる大きさが約4.0kbのDNA断片を挙げることができる。

【0014】この約4.0kbの*bioAbiobD*を含むDNA断片を、各種の制限酵素で切断したときの認識部位数及び切断断片の大きさを下記表1に示す。なお、本明細書において、制限酵素による「認識部位数」は、DNA断片又はプラスミドを、過剰の制限酵素の存在下で完全分解し、それらの分解物をそれ自体既知の方法に従い1%アガロースゲル電気泳動および4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、分離可能な断片の数から決定した値を採用した。

【0015】また、「切断断片の大きさ」及びプラスミドの大きさは、アガロースゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのラムダファージ ( $\lambda$  phage) のDNAを制限酵素HindIIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一アガロースゲル上の泳動距離で描かれる標準線に基づき、また、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのファイ・エックス174ファージ ( $\phi$ X174 phage) のDNAを制限酵素HaeIIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一ポリアクリルアミドゲル上の泳動距離で描かれる標準線に基づき、切断DNA断片又はプラスミドの各DNA断片の大きさを算出する。プラスミドの大きさは、切断断片それぞれの大きさを加算して求める。なお、各DNA断片の大きさの決定において、1kb以上の断片の大きさについては、1%アガロースゲル電気泳動によって得られる結果を採用し、約0.1kbから1kb未満の断片の大きさについては4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって得られる結果を採用した。

【0016】

【表1】

表1

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
<u>BamHI</u>	1	0.8, 3.2
<u>DraII</u>	1	1.2, 2.8
<u>SacI</u>	1	1.8, 2.2
<u>XbaI</u>	1	1.3, 2.7

【0017】上記表1中、2.7kbのXbaI切断断片もまたジアミノペラルゴン酸アミントランスフェラーゼ及びデスチオビオチンシンセターゼをコードする機能を有していることが確認されており、*bioAbiobD*は、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233染色体DNAを制限酵素SalI及びXbaIで切り出すことによって得られる大きさが約2.7kbのDNA断片中に含まれるものと考えられる。

【0018】以上に詳述した大きさが約4.0kbの*bioAbiobD*を含むDNA断片の制限酵素切断点を図1に示す。上記したプレビバクテリウム・フラバムMJ

-233の染色体を、制限酵素SalIを用いて切り出すことにより得られる大きさが約4.0kbのDNA断片を用いて、その塩基配列をプラスミドpUC18またはpUC19を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法 (dideoxy chain termination法) (Sanger, F. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463, 1977) により決定することができる。このようにして決定した塩基配列中に423個のアミノ酸をコードする1269塩基対より成る*bioA*オープンリーディングフレームおよび224個のアミノ酸をコードする67

2塩基対より成る b i o D オープンリーディングフレームが存在し（特願平3-174757号明細書参照）、該オープンリーディングフレームの上流部分がプロモーター機能を有すると考えられた。

【0019】次に、該オープンリーディングフレームの上流部分のプロモーター機能を有すると考えられるDNA領域上の上流および下流の配列に相当する適当な塩基配列、例えば後記配列表の配列番号：2および配列番号：3に示される塩基配列を化学合成し、これをプライマ-DNAとして用いて、プロモーター機能を有すると考えられるDNA領域を増幅することができる。プライマ-DNAの合成は、例えばベックマン社製DNA合成機System-1 Plusを用いて合成でき、DNA領域の増幅は、例えばDNAサーマルサイクラー408型（宝酒造社製）を用いてNature, 324, p 163 (1986年)に記載の方法により行うことができる。かくして得られる増幅DNA断片がコリネ型細菌内でプロモーター機能を有することは、該DNA断片をコリネ型細菌内で自律増殖可能なプロモーター検出用ベクターに組み込むことによって確認することができる。

【0020】「コリネ型細菌内で自律増殖可能なプロモーター検出用ベクター」としては、例えば、コリネ型細菌内で自律増殖可能なDNA断片（a）と、プロモーターが欠失している発現されるべきタンパク質をコードする構造遺伝子を含むDNA断片（b）（以下これを「発現されるべき遺伝子」と略称することがある）とを保有するプラスミドであれば特に制限はない。このプラスミド検出用ベクターの具体例としては、コリネ型細菌内で自律増殖可能なDNA断片（a）としてブレビバクテリウム・スタチオニス（Brevibacterium stationis）IFO12144 (FERM B P-2515) 由来のプラスミドpBY503を制限酵素Kpn Iで切り出すことによって得られる約6kbのDNA断片、プロモーターが欠失している発現されるべきタンパク質をコードする構造遺伝子を含むDNA断片（b）としてエシェリヒア・コリのトランポゾンTn9由来のクロラムフェニコール耐性遺伝子であるクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）をコードする遺伝子を保有するプラスミドpPR3（特開平3-147792号明細書参照）を挙げることができる。

【0021】次に、上記プラスミド検出用ベクターを用いてプロモーター機能を有するDNA断片の検出法を述べる。先ず、上記プラスミド検出用ベクターを、それ自体既知の通常用いられる形質転換法、例えば電気パルス法（Agricultural and Biological chemistry, 54, 443, (1990) 参照）等で前記コリネ型細菌、例えばブレビバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERMBP-1497) へ導入し、形質転換株を適当な培地で培養し、プロ

モーターが欠失している発現されるべき遺伝子（b）が発現しないことを確認しておく。ここで、プロモーターが欠失している発現されるべき遺伝子（b）の発現の有無および発現強度の測定は、該遺伝子（b）が薬剤耐性遺伝子である場合はその薬剤を含有する選択培地で培養し、形質転換株の薬剤感受性を調べることで容易に行うことができる。また発現の有無および発現強度は、形質転換株を通常用いられる培地で培養し、培地中の発現されるべき遺伝子（b）の発現産物を、該遺伝子の発現産物の性質を利用して調べることもできる。

【0022】次に、発現されるべき遺伝子（b）がコリネ型細菌内で発現していないことが確認できたプラスミド検出用ベクター、例えばpPR3の発現されるべきCAT遺伝子の上流部位を適当な制限酵素、例えばBam HIで解裂し、該部位に前記 b i o A b i o D を含むDNA断片由来の増幅DNAをDNAリガーゼ処理により連絡し、コリネ型細菌へ電気パルス法等により導入する。得られる形質転換株を培養し、前記した発現されるべき遺伝子（b）の確認法により、形質転換株の該遺伝子の発現の有無及び強度を調べることにより、挿入されたDNA断片のプロモーター機能を確認することができる。

【0023】かくして得られる本発明のプロモーター機能を有するDNA断片としては、後記配列表の配列番号：1に示される285塩基対より成るDNAを挙げることができる。上記した後記配列表の配列番号：1に示される塩基配列を包含して成る本発明のプロモーター機能を有するDNA断片は、天然のコリネ型細菌染色体DNAから分離された b i o A b i o D を含むDNA断片に由来するもののみならず、通常用いられるDNA合成装置、例えばベックマン社製System-1 Plusを用いて合成されたものであってもよい。

【0024】また、前記の如くブレビバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAから増幅して得られる本発明のDNA断片は、プロモーター機能を実質的に損なうことがない限り、塩基配列の一部の塩基が他の塩基と置換されていてもよく又は削除されていてもよく、或いは新たに塩基が挿入されていてもよく、さらに塩基配列の一部が転位されているものであってもよく、これらの誘導体のいずれもが、本発明のプロモーター機能を有するDNA断片に包含されるものである。

#### 【0025】

【実施例】次に実施例により本発明をさらに具体的に説明する。しかしながら、下記の実施例は本発明について具体的な認識を得る一助としてのみ挙げたものであり、これによって本発明の範囲は何ら限定されるものではない。

#### 【0026】実施例1

ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233由來のジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチ

## オピオチンシンセターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片(bioAbioD断片)のクローニング

### (A) ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNAの抽出

半合成培地A培地 [組成: 尿素2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  7g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g、 $\text{MgSO}_4$  0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  6mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$  6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ビオチン200 $\mu$ g、塩酸チアミン200 $\mu$ g、グルコース20g、蒸留水1リットル] 1リットルに、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む10mM  $\text{NaCl}$ -20mMトリス緩衝液 (pH 8.0)-1mM EDTA-2Na溶液15mlに懸濁した。次にプロテナーゼKを、最終濃度が100 $\mu$ g/mlになるように添加し、37℃で1時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.5%になるように添加し、50℃で6時間保温して容菌した。この溶菌液に、等量のフェノール/クロロホルム溶液を添加し、室温で10分間ゆるやかに振盪した後、全量を遠心分離 (5,000×g、20分間、10~12℃) し、上清画分を分取し、酢酸ナトリウムを0.3Mとなるように添加した後、2倍量のエタノールをゆっくりと加えた。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス棒でまきとり、70%エタノールで洗浄した後、風乾した。得られたDNAに10mMトリス緩衝液 (pH 7.5)-1mM EDTA-2Na溶液5mlを加え、4℃で一晩静置し、以後の実験に用いた。

### 【0027】(B) 組換え体の創製

上記(A)項で得たブレビバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNA 90 $\mu$ lを制限酵素Sau3AI 1unitを用い、37℃で20分間反応させ部分分解した。この部分分解DNAにコスミドpWE15 (ストラタジーン社製) を制限酵素BamHIで切断した後、脱リン酸化処理したものを混合し、50mMトリス緩衝液 (pH 7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM  $\text{MgCl}_2$  及びT4DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、4℃で15時間反応させ、結合させた。

### 【0028】(C) ビオチン生合成に関与する酵素をコードする遺伝子を含むコスミドの選抜

上記(B)項で得たコスミド混液を用い、前記エシェリヒア・コリR873 (bioA4) 株を形質導入し、アンピシリン50mgを含む選択培地 [ $\text{K}_2\text{HPO}_4$  7g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1g、カザミノ酸10g、グルコース2g及び寒天16gを蒸留水1リットルに溶解] に塗沫した。なお形質導入には、宝酒造より販売さ

れている入 DNA in vitro Packaging Kitを用いて行った。培地上の生育株を常法により、液体培養し、培養液よりコスミドDNAを抽出し、該コスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、コスミドpWE15の長さ8.8kbのDNA断片に加え、長さ約30kbのDNA断片が認められた。本コスミドをpWE15-bioAと命名した。

### 【0029】(D) bioAbioD断片のプラスミドpBluescriptIIへのサブクローニング

上記(C)項で得たコスミドpWE15-bioAに含まれるDNA挿入断片は約30kbと大きく、実用的でないので、得られた断片のうち必要な部分だけに小型化するために、プラスミドpBluescriptII (ストラタジーン社より市販) ヘジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオビオチンシンセターゼをコードする遺伝子 (bioAbioD) を含むDNA断片を下記のとおりサブクローニングした。

【0030】上記(C)項で得たコスミドpWE15-bioAを制限酵素SalIで切断したものと、プラスミドpBluescriptIIを制限酵素SalIで切断したものを混合し、50mMトリス緩衝液 (pH 7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM  $\text{MgCl}_2$  及びT4DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ、結合させた。

【0031】得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法 (Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970) に従いエシェリヒア・コリR873 (bioA4) 株を形質転換し、アンピシリン50mgを含む選択培地 [ $\text{K}_2\text{HPO}_4$  7g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1g、カザミノ酸10g、グルコース2g及び寒天16gを蒸留水1リットルに溶解] に塗沫した。

【0032】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpBluescriptIIの長さ3.95kbのDNA断片に加え、長さ4.0kbの挿入DNA断片が認められた。このプラスミドを用い、上記方法に従い前記エシェリヒア・コリR877 (bioD19) 株を形質転換し、アンピシリン50mgを含む選択培地 [ $\text{K}_2\text{HPO}_4$  7g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1g、カザミノ酸10g、グルコース2g及び寒天16gを蒸留水1リットルに溶解] に塗沫した。

【0033】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミ

ドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、エシェリヒア・コリR877 (bioA4) 株の形質転換体から得られたプラスミドと全く同様に、プラスミドpBluescriptIIの長さ2.95 kbのDNA断片に加え、長さ約4.0 kbの挿入DNA断片が認められた。長さ約4.0 kbのDNA断片を各種の制限酵素で切断したときの制限酵素認識

表2 プラスミドpBS-bioAD4

制限酵素	認識部位数
HindIII	1
XbaI	2
BamHI	2

上記の制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpBS-bioAD4と命名した。

【0035】以上の結果より、制限酵素SalIで切り出される、ジアミノペラルゴン酸アミントランスクレオチドとデスクレオチドをコードする遺伝子を含む長さ4.0 kbのDNA断片を得ることができた。

#### 【0036】実施例2

##### bioA及びbioD遺伝子を含むDNA断片の塩基配列の決定

###### (A) デレーションミュータントの作製

実施例1で得られたプラスミドpBS-bioAD4 (pBluescriptIIのSalIサイトに4.0 kbの断片が挿入されたプラスミド) 30 μgを制限酵素XbaIを用いて37℃、1時間反応により切断した。この反応液を75℃で15分間加熱して制限酵素を失活させたのち、1 mM thioc-dNTPを2 μl、クレノー断片 (klenow fragment) 5 unitsを加え、室温で10分間反応した。反応液と同量のフェノール/クロロホルム (1:1) で切断断片を抽出したのち、2.5倍量のエタノールを加えDNAを沈殿させた。遠心分離後、真空乾燥しDNAを回収した。このDNAを溶解し、制限酵素EcoRIを用いて37℃、1時間反応により切断した。この溶液と同量のフェノール/クロロホルム (1:1) でDNA断片を抽出したのち、2.5倍量のエタノールを加えDNAを沈殿させ、遠心分離後、真空乾燥し、DNAを回収した。得られたDNAを100 μlのExoIIIバッファー [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM β-メルカプトエタノール] に溶解した。このDNA溶液に180 unitsのエキソヌクレオーゼIIIを加え、ボルテックスにて攪拌し、37℃にて反応した。この溶液を1分毎に10 μlずつ、予め準備した100 μlのMBヌクレオーゼバッファー [40 mM酢酸ナトリウムpH 4.5, 100 mM NaCl, 10%グリセロール] 中へ順次加え、65℃、5分間の処理によりエキソヌクレオーゼIIIを失活させた後、37℃にもどし、50 u

部位数および切断断片の大きさは、前記表1に示したとおりであった。このDNA断片の制限酵素切断点地図を図1に示す。また上記で得られたプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表2に示す。

#### 【0034】

##### 【表2】

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
HindIII	1	6.95
XbaI	2	4.25, 2.7
BamHI	2	3.75, 3.2

nitsのMung Beanヌクレオーゼを加え、30分間反応した。同量の10 mM Tris-HCl - 1 mM EDTA飽和フェノールで1回、上清をクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) で1回DNAをそれぞれ抽出した。上清に、2.5倍量のエタノールを加え、遠心分離にて沈殿を回収し、70%エタノールで洗浄したのち真空乾燥した。得られたDNAを50 μlのクレノーバッファー [7 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 mM EDTA, 20 mM NaCl, 7 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM dNTPs] に溶解させた後、2 unitsのクレノー断片を加え、37℃、15分間反応した。この溶液に2.5倍量のエタノールを加え、遠心分離にて沈殿を回収し、70%エタノールで洗浄後、真空乾燥した。得られたDNAを40 μlのTEバッファーに溶解し、10 mMジチオスレート、1 mM ATP, 10 mM MgCl<sub>2</sub> およびT4 DNAリガーゼ5 unitsの各成分を添加し、37℃で15時間反応させ結合した。得られたDNA混合物を用いてエシェリヒア・コリJM109 (宝酒造社製) を形質転換し、アンビシリンを50 μl/m1含むLB培地 [10 gトリプトン, 5 g酵母抽出物, 5 g NaCl, 16 g agar/1 l] に塗沫した。生育したコロニーよりプラスミドを抽出し、インサートDNAの大きさをしらべ、インサートの大きさが200 bpから4 kbまで約250 bpおきに20クローンを選抜した。同様にして逆方向のクローンについても20クローン選抜した。

#### 【0037】(B) ディデオキシ(dideoxy)法によるデレーションミュータントの塩基配列の決定

上記で得られた菌体を白金耳で10 mlの2×TY培地 [16 gトリプトン, 8 g酵母抽出物, 5 g NaCl/1 l] に植菌し、150 μg/mlになるようにアンビシリンを添加した。37℃でO.D.が0.3になるまで生育させた後、ヘルパーFージM13KO7を10<sup>8</sup>/mlになるように添加した。37℃で1時間培養した後、25分の1量を新しい10 mlの2×TY培地に植菌し、カナマイシンを70 μg/mlになるように添加し、37℃で12時間培養した。培養液1.5 ml

をエッペンドルフチューブに分注し、遠心し菌体をのぞき、上清の1. 2mlを新しいエッペンドルフチューブにうつした。200μlのPEG/NaCl溶液[20%PEG, 2. 5M NaCl]を加え室温で15分間静置した。遠心により上清をのぞき沈殿を回収した。沈殿を100μlのTEバッファーに懸濁し、50μlのTE飽和フェノールを加えDNAを抽出した。上清に、10μlの3M酢酸ナトリウム250μlのエタノールを加えDNAを沈殿として回収した。真空乾燥させ、30μlのTEバッファーに溶解した。シーケンスの反応にはシーケナーゼVent, 2. 0DNAシーケンシングキット(東洋紡製)を用いた。4つのシーケンスレーン用にまず1つのチューブの中で、アニーリング、及びラベリングを行なった。エッペンドルフチューブに1μlのプライマー、2μlのシーケンス用バッファー、7μlの上記で調製したDNA溶液を入れ、よく混合し55℃で1時間反応した。4倍に希釈したラベリング反応液を2μl加え、さらに1μlの0. 1M DTT, 5μCiのα-<sup>35</sup>S dCTP, 2μlの希釈シーケナーゼを加え、37℃で5分間反応した。A, G, C, T用のターミネーションミックスを十本のチューブに2. 5μlずつ分注し、ラベリング反応が終了した反応液を3. 5μlずつ分注した。37℃で5分間反応した後、反応停止液を4μlずつ添加した。各反応液を3μlずつゲルにのせ、1500Vで4時間電気泳動を行ない、X線フィルムにてバンドを検出した。塩基配列決定の結果、図1において、Sac Iの上流132bpからBam HIの下流100bpまでにbioAをコードしていると考えられるオープンリーディングフレーム、Bam HIの下流に7bpからSal Iの34bp上流にbioDをコードしていると考えられるオープンリーディングフレーム(特願平3-174757号明細書参照)、さらに、Sac Iの上流429bpから133bpのあいだにプロモーター機能を有すると考えられる後記配列表の配列番号:1に示す285塩基対の領域が存在していた。

#### 【0038】実施例3

##### プロモーター機能を有するDNA断片の単離

###### (A) DNA領域の増幅に使用するプライマー-DNAの合成

実施例2において決定したbioAbioDを含むDNA断片の配列をもとに、Sac Iサイトの上流429bpから133bpの配列番号:1に示される285塩基対の領域を増幅してクローニングするために、5'→3'プライマーとして、5'-CCGGATCCAGTCCTGTTGCTTGGGTTG-3' (配列番号:2)、3'→5'プライマーとして、5'-CCGGATCCTTCCTCCGTCACTTGGTTT-3' (配列番号:3) の28merをベックマン社製DNA合成機System-1 plusを用いて合成し

た。

#### 【0039】(B) プロモーター機能を有する断片の増幅

反応液[50mM KC1, 10mM TrisHCl(pH8.8), 1. 5mM MgCl<sub>2</sub>, 100μg/mlゼラチン, 200μM dNTPs, 250pmolプライマー]に、2. 5unitsのTaqポリメラーゼ、1ngのDNAを添加し、ディネーチャー94℃1分間、アニーリング37℃、2分間、ポリメライゼーション72℃、3分間の反応を、DNAサーマルサイクラー408型(宝酒造社製)で25回くりかえすことによりDNA断片を増幅させた。増幅DNA断片の確認は4%アガロースゲル電気泳動により285塩基対のDNA断片を視認することにより行なった。

#### 【0040】実施例4

##### プロモーター機能を有するDNA断片のプラスミドpPR3への導入

特開平3-147792号明細書の記載に基いて調製したプラスミドpPR3 0. 5μgに制限酵素Bam HI(5units)を37℃で1時間反応させ、プラスミドDNAを完全に分解した。

【0041】実施例3で調製したプロモーター機能を有するDNA断片とプラスミドDNA分解物を混合し、制限酵素を不活化するために65℃で10分間加熱処理した後、該失活溶液中の成分が最終濃度として各々50mMトリス緩衝液pH7. 6、10mM MgCl<sub>2</sub>、1. 0mMジチオスレイトール、1mM ATP及びT4DNAリガーゼ1unitになるように各成分を強化し、16℃で15時間保温した。この溶液を用いてエシエリヒア・コリHB101のコンピテントセル(宝酒造社製)を形質転換した。

【0042】形質転換株は50μg/ml(最終濃度)のカナマイシンを含むL培地[トリプトン10g、酵母エキス5g、NaCl 5g、蒸留水1l、pH7. 2]で37℃にて24時間培養し、生育株として得られた。これら生育株のプラスミドをアルカリ-SDS法[T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook; "Molecular cloning" (1982) 90~91参照]により抽出した。

【0043】得られたプラスミドは電気パルス法によりプレビバクテリウム・フラバムMJ-233(FERM BP-1497)プラスミド除去株へ形質転換し、アルカリ-SDS法によりプラスミドを抽出した。このプラスミドの制限酵素Bam HI、Kpn I、Sac I等の制限酵素による切断パターンによってpPR3に前記増幅DNAが組み込まれていることを確認し、このプラスミドを"pPR3-bioA"と命名した。

#### 【0044】実施例5

##### プロモーター強度の測定: 実施例4でpPR3に挿入し

たプロモーターの強度を、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) の活性を測定することによって調べた。

【0045】 p PR3 を保有するブレビバクテリウム・フラバム MJ - 233 株と p PR3 - bioA を保有するブレビバクテリウム・フラバム MJ - 233 株をそれぞれ、実施例 1 の (A) 項に記載の半合成培地 A 培地にカナマイシンを 50 μg/ml 加えた培地 10 ml の入った試験管で一晩前培養し、その培養液を上記の培地 100 ml の入った三角フラスコで約 6 時間培養後集菌し、CAT の活性測定に用いた。CAT の活性は W. V. Shaw らの方法 [J. Bacteriology Jan. (1968) 28~36 参照] により測定した。その結果、p PR3 - bioA を有する MJ - 233 株は、プロモーターの挿入されていない p PR3 を有する MJ - 233 株の約 10 倍の CAT 活性をもつてい

配列：

AGTCCTGTTG CTTGGGTTTG ATCAAGGCCT AATCCACCGG CTGCAACATC AAAATACAGG 60  
TAGTACACCA AGAGTGCTTG CATGCCGTAG AAGCTGAATC GCTCCACAT TTCAATACTG 120  
ATTATTGAGG TTGCGCTTTT GAACCTAACCG CGTTGATCCA GTTGGACCAT GACTTCTCCT 180  
AACAGAAAGC TGCGGCAATG AAAAACACTT AGTGCACAAA ATTGAACACT GTTCAATTAA 240  
CCTATTACAC TGCACATATG CAACCAAACC AAGTGACCGGA GGAAA 285

【0047】配列番号：2

配列の長さ：28

配列の型：核酸

配列：

COGGATCCAG TCCTGTTGCT TGGGTTTG

28

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

【0048】配列番号：3

配列の長さ：28

配列の型：核酸

配列：

COGGATCCTT TCCTCCGTCA CTTGGTTT

28

【図面の簡単な説明】

【図1】大きさが約 4.0 kb のジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオビオチンシンセ

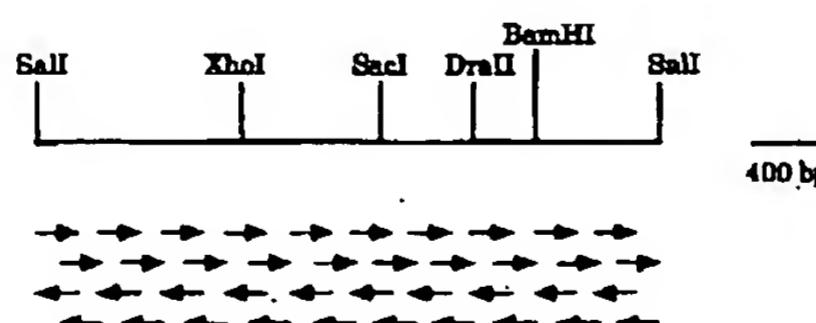
鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片の制限酵素による切断点地図、および塩基配列決定のための戦略図。

### 【図1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号 庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:13)